

10/525480

Rec'd BYPTO 24 FEB 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. März 2004 (25.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/025273 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 1/31**

(72) Erfinder; und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/050309

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): POSTHUMA, George
[NL/NL]; Boswijkstraat 26, NL-3941 ZN Doorn (NL).

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Juli 2003 (16.07.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (national): CN, JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

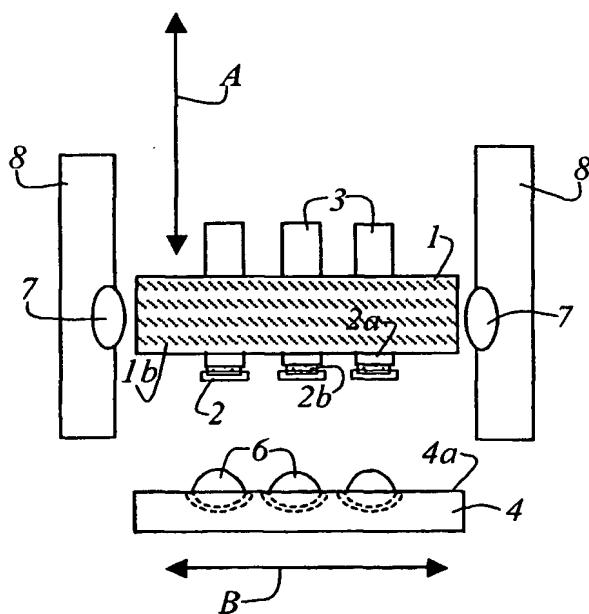
(30) Angaben zur Priorität:
102 39 739.2 29. August 2002 (29.08.2002) DE

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LEICA MIKROSYSTEME GMBH [AT/AT]; Hernalser Hauptstrasse 219, A-1170 Wien (AT).

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR CARRYING OUT IMMUNOLOGICAL MARKING TECHNIQUES FOR THIN-SECTIONED TISSUE

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR DURCHFÜHRUNG VON IMMUNOLOGISCHEN MARKIERUNGSTECHNIKEN FÜR GEWEBEDÜNNSCHNITTE



(57) Abstract: The invention relates to a device and a method for carrying out in an optimized and automated manner immunological marking techniques for thin-sectioned tissue (2b). A support plate (1) which can be automatically moved by means of a computer-controlled conveying device (20) and on which several thin sections of tissue (2b) are placed on small metal nets (2) is immersed like a die into a liquid that is composed of a washing and marking solution (6) and is placed in several recesses (5) within an object support (4). Said object support can also be automatically moved.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur optimierten und automatisierten Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnsschnitte (2b). Dabei wird eine durch eine computergesteuerte Transportvorrichtung (20) automatisch bewegliche Trägerplatte (1) auf der mehrere Gewebedünnsschnitte (2b) auf Metallnetzchen (2) positioniert sind, wie ein Stempel in eine Flüssigkeit aus Wasch- oder Markierungslösung (6) getaucht, die sich in mehreren Vertiefungen (5) in einem ebenfalls automatisch beweglichen Objekträger (4) befinden.

WO 2004/025273 A1

Vorrichtung und Verfahren zur Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnschnitten auf einer Trägerplatte mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit.

5 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Gewebedünnschnitten auf einer Trägerplatte mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit.

Um die Struktur von biologischen Proben, wie Geweben oder Zellen im
10 Elektronenmikroskop untersuchen zu können, werden Ultradünnschnitte von nur wenigen nm Größe angefertigt, die auf Objektträgernetze aus Metall (im folgenden als Metallnetzchen bezeichnet), bevorzugt aus dem Metall Nickel aufgebracht werden. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung werden die Schnitte kontrastiert oder durch
15 spezielle oder cytochemische Verfahren einzelne Bestandteile der Probe markiert. Häufig beruhen diese cytochemischen Verfahren auf dem Prinzip der Ligandenpaarbildung, wobei ein erster Ligand in der biologischen Probe enthalten sein kann und der zweite Ligand dann, wenn er mit dieser Probe in Kontakt kommt, als Bindungspartner an den ersten Ligand bindet. Beispiele für Ligandenpaare auf biologischer Basis
20 stellen Antigen/Antikörper-Bindungspaare, Enzym/Substrat- Bindungspaare, Lektine/Zucker, Hormon/Rezeptor-Systeme, DNA/DNA- und DNA/RNA-Paare dar.

Im Stand der Technik sind zahlreiche Verfahren bekannt, bei denen das Antigen/Antikörper-Bindungspaar beteiligt ist, sie werden unter dem Begriff der Immunhisto- und Immuncytochemie zusammengefasst (im folgenden als immunologische Markierungstechniken bezeichnet).

- 5 Das US-Patent 5,143,714 offenbart beispielsweise ein Verfahren, das ein Antigen aus einer flüssigen Probe in einer pelletierbaren Gelsubstanz adsorbiert. Das Gelpellet wird mit einer Diffusionsbarriere umgeben, als Block in eine ausgestanzte Gelmatrix integriert und im Folgenden wie eine Gewebeprobe immunologischen Markierungstechniken unterzogen. Die DE 38 78 167 T2 beschreibt die Verwendung von kolloidalen Goldteilchen zur Markierung von Liganden in der Immunogold Staining Technique. Ein stark verbessertes Verfahren, das die qualitative und quantitative Auswertung eines Antigens in einer Probe erlaubt, offenbart das US-Patent 5,079,172 mit einem Sandwich-Assay, indem der das Antigen bindende erster Antikörper mit einem Gold markierten zweiten Antikörper, der den ersten Antikörper bindet, markiert wird. Im elektronenmikroskopischen Auswerteverfahren kann anhand der Menge der Goldpartikel das Antigen der Probe qualitativ und quantitativ ermittelt werden.
- 10 15 20 25

Vielen Protokollen der Immunhisto- und Immuncytochemie zur immunologischen Markierung von Gewebedünnschnitten ist gemeinsam, dass sie meist aus 10 bis 20 einzelnen Verfahrensschritten bestehen. Zu einem Großteil bestehen die Verfahrensschritte aus Waschvorgängen der zu untersuchenden Probe mit Puffer- oder Markierungslösung. Diese Waschvorgänge werden derzeit in einem aufwendigen Prozess manuell durchgeführt, wobei mit einer Pipette einzelne Tropfen der wässrigen Puffer- oder Markierungslösung auf eine hydrophobe Unterlage (z.B. Parafilm®, Parlodion®, Colloidion oder Formfan®) aufgebracht werden. Die Metallnetzchen mit den Gewebedünnschnitten wer-

den nach unten einzeln darauf gelegt, um mit der Behandlungsflüssigkeit zu reagieren. Wegen des geringen Gewichts des Metallnetzchens und der Oberflächenspannung des Flüssigkeitstropfen, schwimmt das Metallnetzchen dabei auf der Tropfenoberfläche. Nach einer bestimmten Verweildauer für diesen Schritt (häufig 5-10 min) wird das Metallnetzchen mit einer Pinzette zum nächsten Tropfen weiter transportiert. Dieser Vorgang wird bis zur letzten Position des Standardprotokolls fortgeführt und bindet eine Arbeitskraft bis zu mehreren Stunden pro immunologischer Markierungsreaktion.

10 Es ist leicht ersichtlich, dass dieser manuelle Prozess kontinuierliche Aufmerksamkeit des Arbeitspersonals fordert und durch den großen Zeitaufwand hohe Arbeitskosten mit sich bringt. Die Zahl der gleichzeitig zu bearbeitenden Proben ist stark limitiert und Fehler seitens des Arbeitspersonals beim exakten Pipettieren und Positionieren der Flüssigkeitstropfen mit kleinsten Volumina nicht auszuschließen. Das manuelle Verfahren kann eine Verwechslung der Proben nach der langen Behandlungszeit während der immunologischen Markierung nicht ausschließen, dies könnte durch Verwendung eines Probenträgers mit Kennzeichnung in Form eines Chips oder Barcodes, wie es in dem Gebrauchsmuster DE 299 06 382 U1 dargestellt ist, verhindert werden.

15 Zusätzlich stellt die Verdunstung der Flüssigkeitstropfen bei länger dauernden Standardprotokollen ein großes Problem dar.

Zwar offenbart das Gebrauchsmuster DE 298 17 912 U1 eine Vorrichtung zum Waschen von mikroskopierbaren Präparaten auf Trägern nach immunocytochemischer Behandlung, allerdings handelt es sich hierbei um eine Waschbox in der eine größere Menge an Waschlösung mit einer gewissen Strömungsgeschwindigkeit über Präparat und Träger hindurchströmt. Für die Durchführung von immunologischen Markierungstechniken selber ist diese Vorrichtung nicht geeignet, da die

verwendeten antikörperhaltigen Markierungslösungen sehr teuer sind und daher nur in möglichst geringen Volumina eingesetzt werden.

Bisher ist kein Gerät und kein Verfahren bekannt, das den Vorgang der Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte zufriedenstellend automatisiert.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine geeignete Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnschnitten bereitzustellen, die es erlaubt effektiv, annähernd automatisch und zeitsparend mehrere Gewebedünnschnitte in reproduzierbarer Qualität gleichzeitig zu bearbeiten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einer Vorrichtung gelöst, die die Merkmale Anspruchs 1 umfasst.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es ein Verfahren zur Behandlung von Gewebedünnschnitten für die Durchführung von immunologischen Markierungstechniken bereitzustellen, das es erlaubt effektiv, annähernd automatisch und zeitsparend mehrere Gewebedünnschnitte in reproduzierbarer Qualität gleichzeitig zu bearbeiten.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einem Verfahren gelöst, das Merkmale des Anspruchs 22 umfasst.

20 Die erfindungsgemäße Vorrichtung besteht im wesentlichen aus zwei Teilen, einer Trägerplatte, auf der Metallnetzchen platziert und mittels Magnet gehalten werden und einem Objektträger der Vertiefungen (so genannte „wells“) enthält, die mit mindestens einer Flüssigkeit (Behandlungsflüssigkeiten zur immunologischen Markierung oder Waschlösungen jeweils nach dem Stand der Technik) gefüllt werden können. Die Positionen der Vertiefungen entsprechen dabei in ihrer Anordnung gegenüberliegend den Positionen der Metallnetzchen auf der Trägerplatte. Beide Teile der Vorrichtung können in einer Anordnung in eine

Transportvorrichtung mit steuerbarer Hebe- und Senkfunktion so eingelegt werden, dass die Trägerplatte mit den Metallnetzchen von oben wie ein Stempel mit den Flüssigkeitstropfen in den Vertiefungen des Objekträgers in Berührung kommt. Dieser Vorgang ermöglicht eine

5 Automatisierung von immunologischen Markierungsverfahren für Gewebedünnschnitte für elektronenmikroskopische Untersuchung. Mehrere Objekträger können automatisch einer Behandlungsposition zugeordnet werden und auf einer einzelnen Trägerplatte können eine Vielzahl von Metallnetzchen angebracht sein, so dass sich die Anzahl der

10 gleichzeitig zu bearbeitenden Proben deutlich erhöht. Die Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnschnitten besitzt mindestens eine Trägerplatte, wobei die Gewebedünnschnitte mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit behandelt werden. Gegenüberliegend zu der Trägerplatte ist mindestens ein Objekträger in einer Behandlungsposition

15 angeordnet. Mehrere der Objekträger sind in diese Behandlungsposition automatisch überführbar. Die Trägerplatte definiert eine Unterseite, an der markierte Positionen ausgezeichnet sind, an denen Metallnetzchen mit Gewebedünnschnitten positioniert sind. Ebenso definiert die Trägerplatte eine Oberseite, in der mehrere Bohrungen ausgebildet

20 sind, in denen jeweils ein Magnet steckt. Die Bohrungen sind derart angebracht, dass sie den markierten Positionen gegenüberliegen. Der Objekträger definiert eine Oberseite, die freie Vertiefungen enthält, die zur Aufnahme von Behandlungsflüssigkeit ausgebildet sind.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der in den Figuren schematisch dargestellten Beispiele verdeutlicht. Dabei zeigen:

25

Fig. 1: eine perspektivische Ansicht einer Trägerplatte, die Metallnetzchen trägt;

Fig. 2: eine perspektivische Ansicht eines Objekträgers mit Vertiefungen, die mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit gefüllt werden können;

5 Fig. 3 eine Detailansicht der Trägerplatte und des Objekträgers im Querschnitt;

Fig. 4: eine Draufsicht einer Ausführungsform eines Objekträgers,

Fig. 5 eine perspektivische Ansicht der Transportvorrichtung zum Aufbringen der Trägerplatte auf den Objekträger;

10 Fig. 6 eine schematische Darstellung der Trägerplatte, die durch die Transportvorrichtung annähernd in Kontakt mit einem Objekträger ist;

15 Fig. 7 eine schematische Darstellung der Kammer als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen auf den Objekträgern; und

Fig. 8 eine schematische Darstellung einer anderen Ausführungsform der Kammer als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen auf den Objekträgern.

Fig. 1 zeigt eine erfindungsgemäße Trägerplatte 1, die eine Oberseite 20 1a und eine Unterseite 1b definiert. Auf der Unterseite 1b besitzt die Trägerplatte 1 markierte Positionen, an denen Metallnetzchen 2 mit Gewebedünnschnitten (hier nicht dargestellt) positioniert sind. Bevorzugter weise sind die Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Trägerplatte 1 erhöht. Damit wird verhindert, dass beim Kontakt mit den Flüssigkeitstropfen Flüssigkeitsbrücken zwischen den einzelnen Metallnetzchen 2 entstehen. An der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 befinden sich entgegengesetzt zu den Positionen der Metallnetzchen 2 Bohrungen 3a (siehe Fig. 3), in denen Magnete 3 z. B. Permanentmagnete

stecken. Sie bewirken, dass die Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 durch magnetische Kraft auf ihrem Platz gehalten werden. Der Abstand zwischen Metallnetzchen 2 und Magnet 3 soll möglichst gering (Abstand < 2 mm) gehalten werden. Die Trägerplatte 5 1 besteht vorzugsweise aus formstabilem, nicht magnetischen Material, vorzugsweise aus Aluminium, Messing, faserverstärkte Kunststoffe und ist vorteilhafter weise auf der Unterseite 1b, die die Metallnetzchen 2 trägt, hydrophob beschichtet (z.B. mit einer Teflondruckbeschichtung). Es ist für einen Fachmann selbstverständlich, dass für Form der Trägerplatte 10 1, sowie die Anordnung der Metallnetzchen 2 auf der Trägerplatte 1 zahlreiche Ausführungsformen möglich sind. In der hier dargestellten Ausführungsform sind auf einer rechteckigen Platte mit den Maßen ca. 76 X 26mm (3 X 1 Inch; Objektträgergröße) beispielsweise 10 x 15 3 Metallnetzchen 2 untergebracht, die einen Durchmesser von 3 mm aufweisen. Entscheidend ist, dass die Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 den Bohrungen für die Magnete 3 auf der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 gegenüberliegen und vorzugsweise auch den Positionen mindestens eines Flüssigkeitstropfens 6 auf der Oberseite 4a eines Objektträgers 4 (siehe Fig. 2) gegenüberliegen.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel werden die Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 durch Elektromagnete (nicht dargestellt) gehalten.

Fig. 2 zeigt eine perspektivische Ansicht des erfindungsgemäßen Objektträgers 4, der eine Oberseite 4a und eine Unterseite 4b definiert. Der Objektträger 4 besitzt auf der Oberseite 4a mehrere Vertiefungen 5 (sogenannte „wells“), die in der gezeigten Ausführungsform in Reihe angeordnet und mit jeweils einem Flüssigkeitstropfen 6 gefüllt sind. Der Flüssigkeitstropfen 6 besteht aus einer Wasch- oder Behandlungslösung.

sung wie sie im Stand der Technik offenbart ist. Es ist vorgesehen,
dass sich in den einzelnen Vertiefungen 5 auch unterschiedliche Flüs-
sigkeiten befinden (z.B. eine Reihe von Vertiefungen 5 gefüllt mit
Waschlösung, die nächste Reihe von Vertiefungen 5 gefüllt mit Markie-
5 rungslösung). Der Objektträger 4 ist vorteilhafter weise transparent und
besteht aus formstabilem Material. Vorzugsweise ist der Objektträger 4
aus Glas oder Kunststoff und ist auf der Oberseite 4a, die die Vertie-
fungen 5 trägt, und in den Vertiefungen 5 selber hydrophob beschichtet
(z.B. mit einer Teflondruckbeschichtung 5a). Die Vertiefung 5 ist ident
10 mit der Dicke D (siehe Fig. 3) der Teflonbeschichtung 5a. Die Vertie-
fung 5 beträgt vorzugsweise etwa 50µm. Die Vertiefungen 5 tragen ein
Flüssigkeitsvolumen, das bei Waschlösung etwa 50µl, bei Antikörpern
und Goldlösungen etwa 5µl beträgt. Die Teflondruckbeschichtung ist
für verschiedene Tropfengrößen gleich. Durch die hydrophobe Rand-
15 schicht wölben sich die Flüssigkeitstropfen 6 mehr oder weniger nach
oben. Um die Netzchen mit diesen Tropfen in Berührung zu bringen, ist
es für den Ablauf unbedingt notwendig die Tropfengröße zu kennen, da
die Tropfengröße eine unterschiedliche Position für die Absenkbe-
wegung der Metallnetzchen 2 ergibt.
20 Die räumliche Beziehung des Objektträgers 4 und der Trägerplatte 1
zueinander sind in Fig. 3 als Teilansicht im Querschnitt dargestellt. Die
Teilansicht des Querschnitts ist z.B. in Fig. 2 durch die gestrichelte Li-
nie 32 definiert. In dem hier gezeigten Ausführungsbeispiel ist auf dem
Objektträger 4 eine hydrophobe Beschichtung 5a aufgebracht, die eine
25 Dicke D aufweist. In der Trägerplatte 1 sind Bohrungen 3a für Magnete
3 vorgesehen. Auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 sind markierte
Positionen 2a vorgesehen, von denen jeweils eine ein Metallnetzchen
2 trägt. Das Metallnetzchen 2 ist durch die den markierten Positionen
2a zugeordneten Magnete 3 gehalten. Die gestrichelt-gepunktete Linie

29 in Fig. 3 verdeutlicht, dass die Trägerplatte 1 und der Objektträger 4 derart angeordnet sind, dass jeweils eine markierte Positionen 2a mit Metallnetzchen 2 einer Vertiefung 5 gegenüberliegt.

Fig. 4 zeigt den Objektträger 4 in der Draufsicht. Dabei ist eine weitere 5 Ausführungsform des Objektträgers 4 dargestellt. Zur Kennzeichnung besitzt der Objektträger 4 vorteilhafter weise eine Kennzeichnung, wie es z.B. in dem Gebrauchsmuster DE 299 06 382 U1 dargestellt ist. Die Kennzeichnung 4c ist auf der Oberfläche 4a des Objektträgers 4 angebracht und kann in Form eines Barcodes oder eines Chips ausgestaltet 10 sein. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass es die für Größe und Form des Objektträgers 4, sowie die Anordnung der Vertiefungen 5 auf der Oberseite 4a des Objektträgers 4 zahlreiche Ausführungsmöglichkeiten gibt. Auf einer rechteckigen Fläche mit den Maßen 76 mm x 26 mm können beispielsweise 10 x 3 Vertiefungen 5 einer Größe von 2 mm bis 15 3 mm enthalten sein. Entscheidend ist, dass die Positionen der Flüssigkeitstropfen 6 auf der Oberseite 4a des Objektträgers 4 in ihrer Anordnung den Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1a der Trägerplatte 1 gegenüberliegen (siehe Darstellung Fig. 3).

Fig. 5 zeigt die erfindungsgemäße Trägerplatte 1 in einer Transportvorrichtung 20 mit steuerbarer Hebe- und Senkfunktion. Die Transportvorrichtung 20 ist derart ausgestaltet, dass mehrere Objektträger 4 mit der Trägerplatte 1 nacheinander in Kontakt gebracht werden können. Die Transportvorrichtung 20 wird derart gesteuert, dass die Positionen der Vertiefungen 5 des Objektträgers 4 mit den darin befindlichen Flüssigkeitstropfen 6 exakt den Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 gegenüberliegen. Dabei wird die Trägerplatte 1 mittels eines Motors 21 der Transportvorrichtung 20 von oben 25 parallel und seitlich zentriert, bis die Positionen von Metallnetzchen 2 und der Flüssigkeitstropfen 6 gegenüberliegend übereinstimmen. Die

Transportvorrichtung 20 nähert dann die Trägerplatte 1 an den Objektträger 4 an. Hierzu ist an der Transportvorrichtung 20 eine Schiene 22 vorgesehen, die die in einem Haltekopf 23 der Transportvorrichtung 20 über eine Halterung 9 eingespannte Trägerplatte 1, linear auf den Objektträger 4 absenkt. Die Objektträger 4 sind z.B. auf einer Fördereinrichtung 24 aufgelegt, die die Objektträger 4 in geeigneter Weise zu der Transportvorrichtung 20 bewegt. Die Transportvorrichtung 20 und die Fördereinrichtung 24 werden über eine Computereinheit 25 und entsprechendes Computerprogramm gesteuert und geregelt.

10 Fig. 6 zeigt eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Trägerplatte 1, die sich durch die Transportvorrichtung 20 (siehe Fig. 5), annähernd in Kontakt mit einem Objektträger 4 befindet. Auf der Unterseite 1b besitzt die Trägerplatte 1 markierte Positionen 2a, an denen in erhöhter Position Metallnetzchen 2 mit Gewebedünnnschnitten 15 2b positioniert sind. An der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 befinden sich entgegengesetzt zu den Positionen der Metallnetzchen 2 Bohrungen 3a, in denen Magnete 3 stecken, um die Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 durch magnetische Kraft auf ihrem Platz zu halten.

20 Bei einem bestimmten geringen Abstand zwischen der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 und der Oberseite 4a des Objektträgers 4 benetzen die Flüssigkeitstropfen 6 die Gewebedünnnschnitte 2b auf den Metallnetzchen 2. Der Abstand ist dabei vom Volumen des Flüssigkeitstropfen 6 abhängig und variiert von 0,5 mm bis 4 mm. Der Transport der Trägerplatte 1 und des Objektträgers 4 wird mit einer Linearführung mit Schrittmotorantrieb (nicht dargestellt) durchgeführt. Die Positionen des Objektträgers 4 und der Trägerplatte 1 werden mit Positionssensoren 7 überwacht und entsprechend gesteuert. Zur Steuerung werden die Signale der verschiedenen Positionssensoren 7 verwendet. In der hier

dargestellten Ausführungsform sind parallel angeordnete, vertikale Führungsschienen 8 vorgesehen, über die der Haltekopf 23 (siehe Fig. 5) zusammen mit der in einer Halterung 9 eingespannten Trägerplatte 1 auf den Objektträger 4 abgesenkt werden kann. Die Halterung 30 5 fixiert die Trägerplatte 1 und jeweils einen Objektträger 4 zueinander in einer Behandlungsposition 14 (siehe Fig. 5). Dabei sind die Metallnetzchen 2, die einen Gewebedünnnschnitt 2b tragen, in Kontakt mit den Flüssigkeitstropfen 6 auf der Oberseite 4a des Objektträgers 4. Nach Ablauf einer eingestellten Inkubationszeit wird automatisch der Wechsel 10 der Trägerplatte 1 zum nächsten Arrangement von Flüssigkeitstropfen 6 auf demselben Objektträger 4 oder einem nächsten Objektträger 4 bewirkt. Die Trägerplatte 1 wird dazu automatisch angehoben und der Objektträger 4 um eine Stellung weiter transportiert. Dabei ist in Fig. 6 mit dem Pfeil A die vertikale Transportrichtung der Trägerplatte 1 15 und mit dem Pfeil B die horizontale Transportrichtung des Objektträgers 4 gekennzeichnet.

Der Ablauf des Transports der Objektträger 4 ist im weiteren nicht detailliert beschrieben und kann auf verschiedene Weise realisiert werden. Dem Fachmann sind beispielsweise folgende Anordnungen bekannt: Die Objektträger 4 sind auf einer linearen Fördereinrichtung 24 aufgelegt, die durch einen Motor 26 bewegt wird. Alternativ befinden sich die Objektträger 4 auf einer kreisförmigen Fördereinrichtung 24 gelegt, die ebenfalls mit einem Motor angetrieben wird.

Um eine Volumenreduktion der Flüssigkeitstropfen 6 durch Verdampfen zu vermeiden sind die Objektträger 4 auf der Fördereinrichtung 24 mit einer Abdeckung 10 versehen, so dass dadurch eine Kammer 11 entsteht. In dieser Kammer 11 wird z.B. durch eingelegtes feuchtes Filterpapier 13 auf einer Halterung 12 eine hohe Luftfeuchtigkeit erreicht und die Verdampfung der Flüssigkeitstropfen 6 gering gehalten.

Fig. 7 zeigt eine schematische Darstellung der Kammer 11 als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen 6 auf dem Objektträger 4. In der Kammer befindet sich auf einer Halterung 12 ein Stapel feuchtes Fließpapier 13. Vor dem Kontakt der Flüssigkeitstropfen 6 mit den Metallnetzchen 2 wird die Abdeckung 10 automatisch zumindest teilweise geöffnet.

Fig. 8 zeigt eine schematische Darstellung einer anderen Ausführungsform der Kammer 10 als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen 6 auf den Objektträgern 4. Die Kammer 4 als Verdunstungsschutz sieht in einer anderen Ausführungsform z.B. derart aus, dass sich das feuchte Filterpapier 13 in der Kammer 10 unterhalb des Objektträgers 4 befindet. Bei dieser Ausführungsform sind mehrere Kammern 10 übereinander gestapelt. Dabei ist die nächste Kammer auf der darunter liegenden Kammer platziert und schließt somit diese ab. Die Feuchtigkeit des Filterpapiers 13 dringt von unten seitlich am Objektträger 4 vorbei in die Kammer 10. Der Objektträger 4 steht sozusagen auf Stelzen 28 im Sumpf. Die oberste Kammer 10 ist schließlich mit einem Deckel 27 abgeschlossen. Die Objektträger 4 werden in geeigneter Weise zu der Behandlungsposition 14 transportiert. In der Behandlungsposition wird die Trägerplatte 1 mit dem Objektträger in Kontakt gebracht.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist so angepasst, dass sie folgende Schritte eines bereits bestehenden Standardprotokolls zur immunologischen Markierung von Gewebedünnschnitten automatisch ausführt: Absättigen unspezifischer Bindungen, Antikörper-Inkubation, diverse Waschschritte mit verschiedenen Waschlösungen.

In einer weiteren Ausführungsform ist an der Behandlungsposition die Anbringung einer Wärmequelle beispielsweise in Form einer kleinen elektrischen Widerstandsheizvorrichtung oder einer Kühlleinheit vorgesehen, um die optimale Reaktionstemperatur des Objektträgers 4

und der Flüssigkeitstropfen 6 einzustellen. Diese ist so ausgebildet, dass ein elektrischer Kontakt des Objektträgers die Heiz- bzw. Kühlvorrichtung dieses Objektträgers auslöst. Die Steuerung der Wärmequelle bzw. der Kühleinheit erfolgt per Temperaturfühler am Objektträger 4.

5 oder in der Nähe des Flüssigkeitstropfens und wird durch die geschlossene Computereinheit 25 und ein entsprechendes Computerprogramm reguliert. Die Erwärmung oder Kühlung der Objektträger 4 kann auch durch Kontakt der Objektträger 4 mit einer temperaturgeregelten, metallischen Platte 31 erfolgen.

10 Gegenstand der Erfindung ist darüber hinaus ein Verfahren, mit dem unter Nutzung der beschriebenen Vorrichtung mehrere Metallnetzchen 2 mit darauf befindlichen Gewebedünnschnitten 2b auf einer Trägerplatte 1 zur Behandlung, im besonderen zur Durchführung von immunologischen Markierungen und/oder Waschschritten in reproduzierbarer Qualität gleichzeitig effektiv und zeitsparend bearbeitet werden. Der automatisierte Arbeitsablauf reduziert die Fehlerquelle „Mensch“.

15 Das Verfahren optimiert die Behandlung, im besonderen die Durchführung von immunologischen Markierungen und /oder Waschschritten von Gewebedünnschnitten für elektronenmikroskopische Proben, die einzelnen Protokolle bezüglich Art der Flüssigkeit und Inkubationszeit sind dabei dem Stand der Technik zu entnehmen.

20 Anstelle die Metallnetzchen 2 mit einer Pinzette von einem Flüssigkeitstropfen 6 zum nächsten zu transportieren, werden die Gewebedünnschnitte 2b auf Metallnetzchen 2 positioniert und auf die erfindungsgemäße Trägerplatte 1, die markierte und erhöhte Positionen 2a aufweist und die auf der Unterseite 1b vorteilhafter weise hydrophob beschichtet ist, platziert. Die an der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 befindlichen Magnete 3 halten die Metallnetzchen 2 durch magnetische Kraft auf ihrem Platz (siehe Fig. 6).

25

Die Trägerplatte 1 wird mittels einer Transportvorrichtung 20 mit steuerbarer Hebe- und Senkfunktion (siehe Fig. 5) gehalten und auf die jeweiligen Objektträger 4 abgesenkt.

Mit einer Mikroliterpipette werden Flüssigkeitstropfen 6 exakten Volumens in die Vertiefungen 5 des erfindungsgemäßen Objektträgers 4, eingefüllt. Die Positionen der Flüssigkeitstropfen 6 am Objektträger 4 liegen in der Behandlungsposition 14 den Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Trägerplatte 1 genau gegenüber (siehe Fig. 6).

Der Objektträger 4 ist auf der Fördereinrichtung 24 der Transportvorrichtung 20 aufgelegt. Die Einstellung einer bestimmten Temperatur des Objektträgers 4 und der Flüssigkeitstropfen 6 wird per Computereinheit 25 durch eine Wärmequelle bzw. eine Kühleinheit (nicht dargestellt) die durch elektrischen Kontakt des Objektträgers ausgelöst werden gesteuert.

Die Transportvorrichtung 20 und die Fördereinrichtung 24 arbeiten derart zusammen, dass die Trägerplatte 1 mit den Metallnetzchen 2 parallel und seitlich bezüglich dem Objektträger 4 zentriert ist. Dabei stimmen die Positionen der Metallnetzchen 2 und die der Flüssigkeitstropfen 6 exakt gegenüberliegend überein. Die Abdeckung 10, die die Flüssigkeitstropfen 6 in einer Kammer 11 mit feuchtem Fließpapier 13 vor Verdunstung und dadurch bedingter Volumenreduktion schützt, wird automatisch zumindest teilweise geöffnet. Bei einem bestimmten geringen Abstand zwischen der Trägerplatte 1 und dem Objektträger 4 benetzen die Flüssigkeitstropfen 6 die Metallnetzchen 2. Diese Position wird nun für die jeweils programmierte Inkubationszeit konstant gehalten. Der Abstand ist vom Tropfenvolumen abhängig und variiert von 0,5 mm bis 4 mm. Die motorbetriebene Transportmechanik der Fördereinrichtung 24 und die Transportvorrichtung 20 werden per Computereinheit 25, Computerprogramm und Positionssensoren 7 gesteuert.

Nach Ende der eingestellten Inkubationszeit erfolgt automatisch der Wechsel der Trägerplatte 1 zum nächsten Flüssigkeitstropfen 6. Die Trägerplatte 1 wird automatisch mit der Transportvorrichtung 20 und Sensorsteuerung 7 angehoben und der Objektträger 4 automatisch um 5 eine Position weitertransportiert oder ein nächster Objektträger 4 mit Flüssigkeitstropfen 6 automatisch aus einer Linearführung mit mehreren Objektträgern einem Karussell, einer Kassette oder einem Stapel eingeführt.

Mit diesem Verfahren werden folgende Schritte eines Standardprotokolls zur immunologischen Markierung von Gewebedünnschnitten aus dem Stand der Technik mit mehreren Metallnetzchen 2 und darauf befindlichen Gewebedünnschnitten 2b gleichzeitig automatisch und reproduzierbar ausführt: Absättigen unspezifischer Bindungen, Antikörper-Inkubation, diverse Waschschritte mit verschiedenen Waschlösungen.
10
15

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist einem Fachmann jedoch klar, das Abwandlungen und Modifikationen durchgeführt werden können, ohne den Schutzbereich der Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste

- 1 Trägerplatte
- 1a Oberseite der Trägerplatte
- 1b Unterseite der Trägerplatte
- 5 2 Metallnetzchen
- 2a markierte Positionen auf der Trägerplatte
- 2b Gewebedünnnschnitte
- 3 Magnete
- 3a Bohrungen für Magnete
- 10 4 Objekträger
- 4a Oberseite des Objekträgers
- 4b Unterseite des Objekträgers
- 4c Kennzeichnung am Objekträger
- 5 Vertiefungen („wells“)
- 15 5a Teflonbeschichtung
- 6 Flüssigkeitstropfen
- 7 Positionssensoren
- 8 vertikale Führungsschiene der Transportvorrichtung
- 9 Halterung für Trägerplatte

- 10 Abdeckung des Objektträgers
- 11 Kammer
- 12 Halterung für Fließpapier
- 13 Stapel feuchtes Fließpapier
- 5 14 Behandlungsposition
- 20 Transportvorrichtung
- 21 Motor der Transportvorrichtung
- 22 Führungsschiene der Transporteinrichtung
- 23 Haltekopf
- 10 24 Fördereinrichtung
- 25 Computereinheit
- 26 Motor der Fördereinrichtung
- 27 Deckel
- 28 Stelze
- 15 29 gestrichelt-gepunktete Linie
- 30 Halterung der Transporteinrichtung
- 31 temperaturgeregelte Platte
- 32 gestrichelte Linie
- A Pfeil vertikale Transportrichtung
- 20 B Pfeil horizontale Transportrichtung
- D Dicke

Patentansprüche

- 1) Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnnschnitten (6) auf einer Trägerplatte (1) mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit dadurch gekennzeichnet, dass der Trägerplatte (1) gegenüberliegend ein Objektträger (4) in einer Behandlungsposition (14) zugeordnet ist, und dass mehrere Objektträger in diese Behandlungsposition (14) automatisch überführbar sind.
5
- 2) Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass die Trägerplatte (1) eine Unterseite (1b) definiert, an der markierte Positionen (2a) ausgezeichnet sind, an denen Metallnetzchen (2) mit Gewebedünnnschnitten (2b) positioniert sind und eine Oberseite (1a) definiert, in der mehrere Bohrungen (3a) ausgebildet sind, in denen jeweils ein Magnet (3) steckt, wobei die Bohrungen (3a) den markierten Positionen (2a) gegenüberliegen.
10
- 3) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Positionen (2a) für Metallnetzchen (2) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) als Erhöhung ausgebildet sind.
15
- 4) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Magnete (3) in den Bohrungen (3a) auf der Oberseite (1a) der Trägerplatte (1) Permanentmagnete oder Elektromagnete sind.
20

- 5) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Trägerplatte (1) aus formstabilem Material, vorzugsweise aus Aluminium, Messing, faserverstärkten Kunststoffen, besteht.
- 5 6) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Trägerplatte (1) auf der Unterseite (1b), die die Metallnetzchen (2) trägt hydrophob beschichtet ist.
- 10 7) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Anordnung der markierten Positionen (2a) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) auf denen die Metallnetzchen (2) sitzen, den Positionen der Vertiefungen (5) mit Flüssigkeitstropfen (6) auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) gegenüberliegen.
- 15 8) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Trägerplatte (1) über eine Halterung (9) am Haltekopf (23) an einer Transporteinrichtung (20) mit motorbetriebener Hebe- und Senk-Funktion angebracht ist.
- 20 9) Vorrichtung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet dass die Transporteinrichtung (20) über eine angeschlossene Computerseinheit (25) und Positionssensoren (7) automatisch gesteuert wird.
- 25 10) Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass der Objektträger (4) eine Oberseite (4a) definiert, die freie Vertiefungen (5) enthält, die zur Aufnahme von Behandlungsflüssigkeit (6) ausgebildet sind.

- 11) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, der Objekträger (4) aus transparentem formstabilem Material, vorzugsweise aus Glas oder faserverstärkten Kunststoff besteht.
- 5 12) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, der Objekträger (4) auf der Oberseite (4a), die die Vertiefungen (5) enthält hydrophob beschichtet ist.
- 10 13) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, die Tiefe der Vertiefungen (5) auf der Oberseite (4a) des Objekträgers (4) mit der Schichtdicke der Beschichtung übereinstimmt .
- 14) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, das Flüssigkeitsvolumen der Vertiefungen (5) des Objekträgers (4) 50 µl vorzugsweise 5 µl beträgt.
- 15 15) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, die Behandlungsflüssigkeit eine Markierungs- und/oder Waschlösung zur Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte ist.
- 20 16) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, der Objekträger (4) zur Kennzeichnung eine Speicherleinrichtung (4c) in Form eines Barcodes und/oder Chips aufweist.
- 25 17) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10 dadurch gekennzeichnet dass, die Positionen der Vertiefungen (5) mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf der Oberseite (4a) des Objekträgers (4) in ihrer Anordnung den Positionen der Metallnetzchen (2) auf

ihrer Anordnung den Positionen der Metallnetzchen (2) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) gegenüberliegen.

- 18) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, sich der Objektträger (4) auf einer Fördereinrichtung (24) befindet, die über eine Führungsschiene (22) und einen Motor (26) eine Behandlungsposition einstellt.
5
- 19) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, die Steuerung der Fördereinrichtung (24) über eine angeschlossene Computereinheit (25) und Positionssensoren
10 (7) automatisch erfolgt.
- 20) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10 dadurch gekennzeichnet dass der Objektträger (4) auf der Fördereinrichtung (24) mit einer automatisch wenigstens teilweise zu öffnenden Abdeckung (10) versehen ist, so dass dadurch eine Kammer (11) entsteht.
- 15 21) Vorrichtung gemäß Anspruch 20 dadurch gekennzeichnet dass die Kammer (11) eine Halterung (12) aufweist, in die feuchtes Fließpapier (13) eingelegt wird, so dass in der Kammer (11) eine hohe Luftfeuchtigkeit entsteht und die Verdampfung der Flüssigkeitstropfen (6) auf den Objektträgern (4) gering ist.
- 20 22) Verfahren zur Behandlung von Gewebedünnnschnitten auf einer Trägerplatte (1) mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte: Befüllen mindestens eines Objektträgers (4), auf dem sich Vertiefungen (5) befinden, mit einer Behandlungsflüssigkeit (6); Verbringen des Objektträgers (4) in eine Behandlungsposition; Absenken und die
25 Trägerplatte (1) auf den Objektträger (4), wobei ein Kontakt zwischen der Behandlungsflüssigkeit (6) und den Gewebedünn-

schnitten (2b) hergestellt wird und automatisches Wechseln der Objektträger (4) zu einer nächsten Behandlungsposition.

- 23) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Behandlung der Gewebedünnschnitte (2b) immunologische Markierungsreaktionen und /oder Waschschritte darstellt.
5
- 24) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Behandlung der Gewebedünnschnitte (2b) automatisch durchgeführt wird.
- 25) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass sich die Gewebedünnschnitte (2b) auf Metallnetzchen (2) befinden, die auf markierten und erhöhten Positionen (2a) der Unterseite (1b) der erfindungsgemäßen Trägerplatte (1) sitzen und durch Magnete (3) an der Oberseite (1a) der Trägerplatte (1) auf ihrem Platz gehalten werden.
10
- 15 26) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Trägerplatte (1) mittels einer Halterung (9) an einem Haltekopf (23) einer Transportvorrichtung (20) mit automatischer Hebe- und Senkfunktion befestigt wird.
- 20 27) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch, dass die Vertiefungen (5), die sich auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) befinden, mit einer Markierungs- und/oder Waschlösung zur Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte gefüllt sind.
25
- 28) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch, dass die Transportvorrichtung (20) mit automatischer Hebe- und Senkfunktion den Objektträger (4) in eine Behandlungsposition

bringt, in der die Flüssigkeitstropfen (6) in den Vertiefungen (5) auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) exakt den Gewebedünnschnitten (2b) auf den Metallnetzchen (2) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) gegenüberliegen.

- 5 29) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch, dass sich der Objektträger (4) auf einer Fördereinrichtung (24) befindet, die über eine Führungsschiene (22) und einen Motor (26) in eine Behandlungsposition bewegt wird.
- 10 30) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Steuerung der Transportvorrichtung (20) über eine Computereinheit (25) und Positionssensoren (7) erfolgt.
- 15 31) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Steuerung der Transportvorrichtung (20) so eingestellt ist, dass die Trägerplatte (1) an den Objektträger (4) annähert wird und die Gewebedünnschnitte (2b) auf den Metallnetzchen (2) in Kontakt mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf dem Objektträger (4) kommen.
- 20 32) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass vor dem Kontakt der Gewebedünnschnitte (2b) auf der Trägerplatte (1) mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf dem Objektträger (4) die Abdeckung (10) der Objektträger (4) automatisch zumindest teilweise geöffnet wird.
- 25 33) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass der Kontakt der Gewebedünnschnitte (2b) auf der Trägerplatte (1) mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf dem Objektträger (4) über eine beliebige Inkubationszeit gehalten wird.

34) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass nach Ablauf der Inkubationszeit die Trägerplatte (1) automatisch entlang der Führungsschienen (8) gehoben wird und der Objektträger (4) auf der Fördereinrichtung (24) über eine motorbetriebene Führungsschiene (22) automatisch in eine andere Behandlungsposition wechselt.

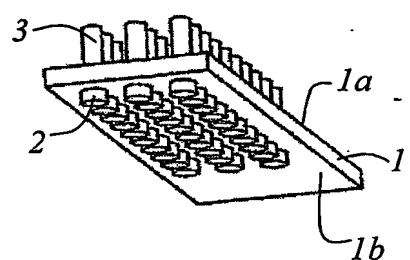
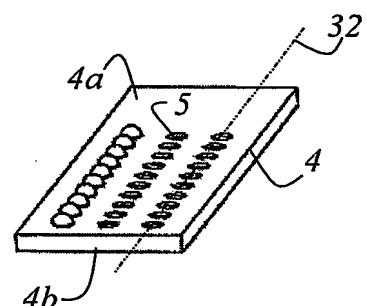
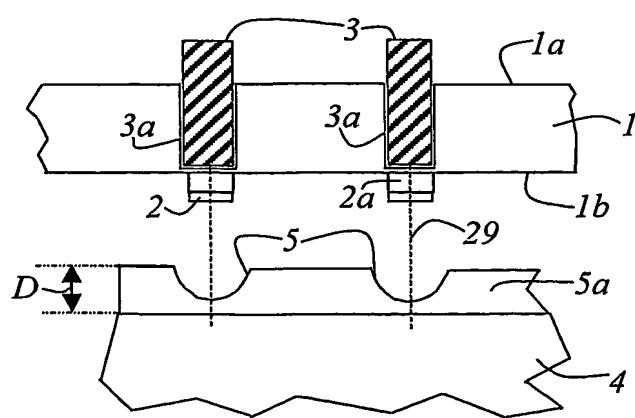
5

35) Verfahren gemäß Anspruch 22, gekennzeichnet dadurch, dass die Trägerplatte (1) eine Unterseite (1b) definiert, an der markierte Positionen (2a) ausgezeichnet sind, an denen Metallnetzchen (2) mit Gewebedünnnschnitten (2b) positioniert sind und eine Oberseite (1a) definiert, in der mehrere Bohrungen (3a) ausgebildet sind, in denen jeweils ein Magnet (3) steckt, wobei die Bohrungen (3a) den markierten Positionen (2a) gegenüberliegen.

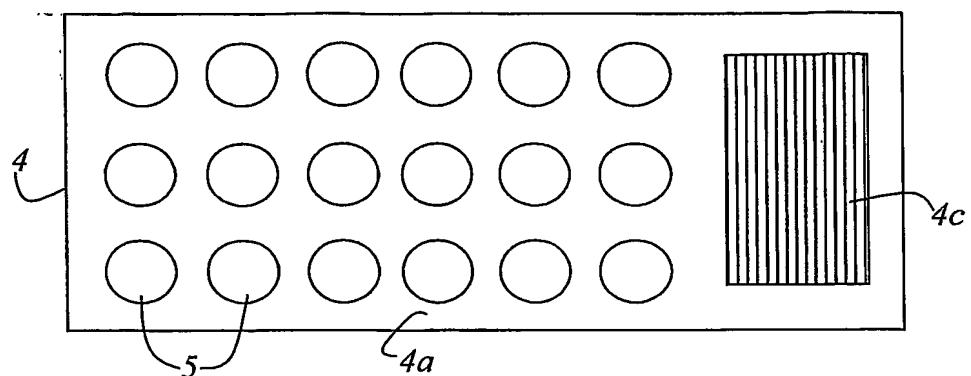
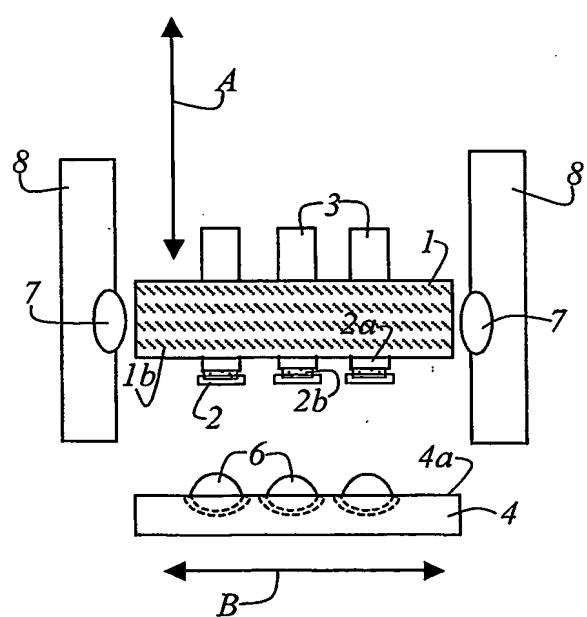
10

15 36) Verfahren gemäß Anspruch 22, gekennzeichnet dadurch, dass der Objektträger (4) eine Oberseite (4a) definiert, die freie Vertiefungen (5) enthält, die zur Aufnahme von Behandlungsflüssigkeit (6) ausgebildet sind.

1/4

**Fig. 1****Fig. 2****Fig. 3**

2/4

**Fig. 4****Fig. 6**

3/4

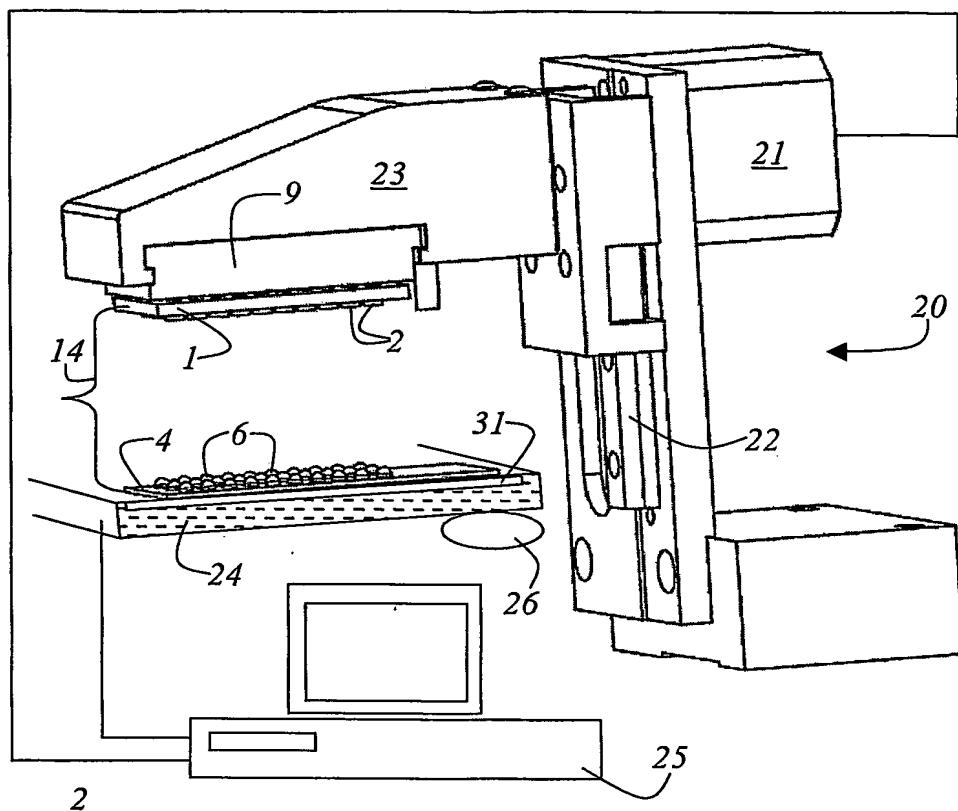
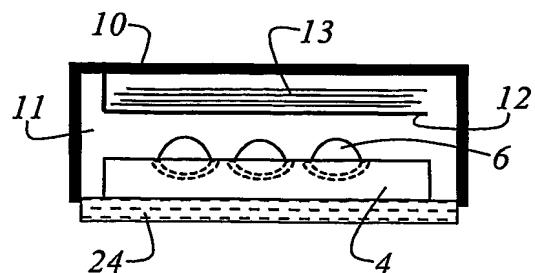
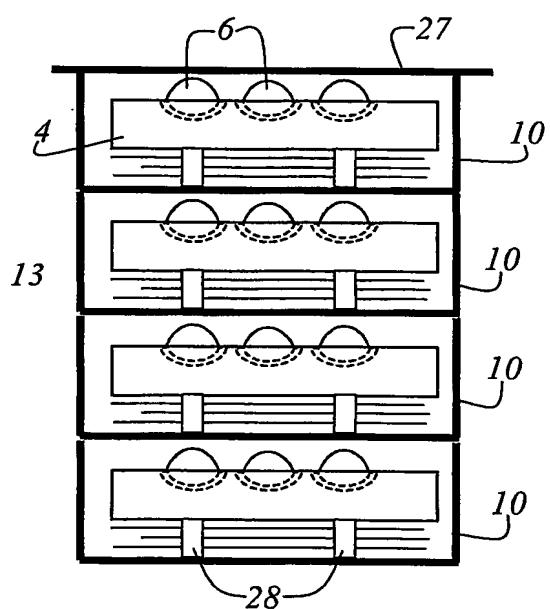


Fig. 5

4/4

**Fig. 7****Fig. 8**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/50309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 GO1N1/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 GO1N GO2B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 350 220 A (JACK ISREELI) 31 October 1967 (1967-10-31) the whole document ----	1,3, 8-10,15, 17, 22-24, 26-28
X	US 3 976 028 A (HOWELLS FRANCIS THOMAS ET AL) 24 August 1976 (1976-08-24)	1,8-10, 15,19, 20, 22-24, 26,27, 29,32 16
Y	the whole document ----	-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 2003

Date of mailing of the international search report

05/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/50309

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 01 04634 A (ANGROS LEE) 18 January 2001 (2001-01-18) page 1, line 8 -page 1, line 18 page 8, line 1 -page 10, paragraph 2 page 13, line 1 -page 13, paragraph 1 page 15, line 1 -page 19, line 25 figures 1-8 ---	1,8-10, 15,18,19 22-24, 26-31, 33,34,36
X	US 4 731 335 A (BRIGATI DAVID J) 15 March 1988 (1988-03-15) column 5, line 24 -column 9, line 26 figures 1-3 ---	1,10,12, 14,15
X A	EP 0 323 130 A (TABATA YOSHIO ;SHIRAIMATSU & CO LTD (JP)) 5 July 1989 (1989-07-05) the whole document ---	1,8-10, 15 22-24, 26,27, 29-31, 33,36
Y	US 2002/114733 A1 (SHOWALTER WAYNE A ET AL) 22 August 2002 (2002-08-22) page 7, column 1, paragraph 4 ---	16
A	US 6 330 106 B1 (GREENWALD ROGER J ET AL) 11 December 2001 (2001-12-11) the whole document ---	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 03/50309

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 3350220	A	31-10-1967	BE CH DE FR GB SE	650439 A 438587 A 1567188 B1 1403182 A 1062972 A 320522 B	11-01-1965 30-06-1967 12-08-1971 18-06-1965 22-03-1967 09-02-1970
US 3976028	A	24-08-1976	GB	1453226 A	20-10-1976
WO 0104634	A	18-01-2001	AU CA EP WO US US US	6079500 A 2379410 A1 1208378 A1 0104634 A1 2003017075 A1 2003170144 A1 6534008 B1	30-01-2001 18-01-2001 29-05-2002 18-01-2001 23-01-2003 11-09-2003 18-03-2003
US 4731335	A	15-03-1988	DE GB JP JP JP JP JP JP JP US US US US	3630866 A1 2180647 A ,B 1804588 C 5011857 B 62098231 A 1932910 C 5240748 A 6070603 B 4801431 A 4798706 A 4777020 A 5023187 A	26-03-1987 01-04-1987 26-11-1993 16-02-1993 07-05-1987 26-05-1995 17-09-1993 07-09-1994 31-01-1989 17-01-1989 11-10-1988 11-06-1991
EP 0323130	A	05-07-1989	JP JP JP JP DE DE EP US	2216458 A 1907598 C 2167473 A 6027682 B 3882507 D1 3882507 T2 0323130 A2 4911098 A	29-08-1990 24-02-1995 27-06-1990 13-04-1994 26-08-1993 03-03-1994 05-07-1989 27-03-1990
US 2002114733	A1	22-08-2002	US US US US US US US US US US US CA DE DE DK EP ES JP JP WO	2002001849 A1 6352861 B1 5654200 A 5595707 A 2002072122 A1 2003022391 A1 6472217 B1 5650327 A 5654199 A 2077452 A1 69117052 D1 69117052 T2 517835 T3 0517835 A1 2085471 T3 5504627 T 3186764 B2 9113335 A1	03-01-2002 05-03-2002 05-08-1997 21-01-1997 13-06-2002 30-01-2003 29-10-2002 22-07-1997 05-08-1997 03-09-1991 21-03-1996 14-11-1996 10-06-1996 16-12-1992 01-06-1996 15-07-1993 11-07-2001 05-09-1991

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 03/50309

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6330106	B1 11-12-2001	US 2002101655 A1	AU 2882800 A	01-08-2002
		EP 1161702 A1		04-09-2000
		JP 2002537579 A		12-12-2001
		WO 0049447 A1		05-11-2002
				24-08-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Recherchenbericht

PCT/EP 03/50309

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N1/31

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 3 350 220 A (JACK ISREELI) 31. Oktober 1967 (1967-10-31) das ganze Dokument ---	1,3, 8-10,15, 17, 22-24, 26-28
X	US 3 976 028 A (HOWELLS FRANCIS THOMAS ET AL) 24. August 1976 (1976-08-24) das ganze Dokument ---	1,8-10, 15,19, 20, 22-24, 26,27, 29,32 16
Y		

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28. Oktober 2003

05/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Internationaler Patentenzenzichen

PCT/EP 03/50309

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	WO 01 04634 A (ANGROS LEE) 18. Januar 2001 (2001-01-18) Seite 1, Zeile 8 -Seite 1, Zeile 18 Seite 8, Zeile 1 -Seite 10, Absatz 2 Seite 13, Zeile 1 -Seite 13, Absatz 1 Seite 15, Zeile 1 -Seite 19, Zeile 25 Abbildungen 1-8 ---	1,8-10, 15,18,19 22-24, 26-31, 33,34,36
X	US 4 731 335 A (BRIGATI DAVID J) 15. März 1988 (1988-03-15) Spalte 5, Zeile 24 -Spalte 9, Zeile 26 Abbildungen 1-3 ---	1,10,12, 14,15
X A	EP 0 323 130 A (TABATA YOSHIO ;SHIRAIMATSU & CO LTD (JP)) 5. Juli 1989 (1989-07-05) das ganze Dokument ---	1,8-10, 15 22-24, 26,27, 29-31, 33,36
Y	US 2002/114733 A1 (SHOWALTER WAYNE A ET AL) 22. August 2002 (2002-08-22) Seite 7, Spalte 1, Absatz 4 ---	16
A	US 6 330 106 B1 (GREENWALD ROGER J ET AL) 11. Dezember 2001 (2001-12-11) das ganze Dokument ---	2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentanzeichen

PCT/EP 03/50309

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 3350220	A	31-10-1967		BE 650439 A CH 438587 A DE 1567188 B1 FR 1403182 A GB 1062972 A SE 320522 B		11-01-1965 30-06-1967 12-08-1971 18-06-1965 22-03-1967 09-02-1970
US 3976028	A	24-08-1976		GB 1453226 A		20-10-1976
WO 0104634	A	18-01-2001		AU 6079500 A CA 2379410 A1 EP 1208378 A1 WO 0104634 A1 US 2003017075 A1 US 2003170144 A1 US 6534008 B1		30-01-2001 18-01-2001 29-05-2002 18-01-2001 23-01-2003 11-09-2003 18-03-2003
US 4731335	A	15-03-1988		DE 3630866 A1 GB 2180647 A , B JP 1804588 C JP 5011857 B JP 62098231 A JP 1932910 C JP 5240748 A JP 6070603 B US 4801431 A US 4798706 A US 4777020 A US 5023187 A		26-03-1987 01-04-1987 26-11-1993 16-02-1993 07-05-1987 26-05-1995 17-09-1993 07-09-1994 31-01-1989 17-01-1989 11-10-1988 11-06-1991
EP 0323130	A	05-07-1989		JP 2216458 A JP 1907598 C JP 2167473 A JP 6027682 B DE 3882507 D1 DE 3882507 T2 EP 0323130 A2 US 4911098 A		29-08-1990 24-02-1995 27-06-1990 13-04-1994 26-08-1993 03-03-1994 05-07-1989 27-03-1990
US 2002114733	A1	22-08-2002		US 2002001849 A1 US 6352861 B1 US 5654200 A US 5595707 A US 2002072122 A1 US 2003022391 A1 US 6472217 B1 US 5650327 A US 5654199 A CA 2077452 A1 DE 69117052 D1 DE 69117052 T2 DK 517835 T3 EP 0517835 A1 ES 2085471 T3 JP 5504627 T JP 3186764 B2 WO 9113335 A1		03-01-2002 05-03-2002 05-08-1997 21-01-1997 13-06-2002 30-01-2003 29-10-2002 22-07-1997 05-08-1997 03-09-1991 21-03-1996 14-11-1996 10-06-1996 16-12-1992 01-06-1996 15-07-1993 11-07-2001 05-09-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Anmeldenummern

PCT/EP 03/50309

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6330106	B1 11-12-2001	US 2002101655 A1	01-08-2002
		AU 2882800 A	04-09-2000
		EP 1161702 A1	12-12-2001
		JP 2002537579 A	05-11-2002
		WO 0049447 A1	24-08-2000